

⑩ 日本国特許庁(J P)  
 ⑪ 公表特許公報(A)

⑫ 特許出願公表

昭63-503138

⑬ 公表 昭和63年(1988)11月17日

⑭ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求有	⑮ 出願 昭和63年(1988)11月17日
A 61 K 39/395		L-7252-4C	予備審査請求有	部門(区分) 3(2)
43/00		7252-4C		
45/00		7252-4C※		(全 9 頁)

⑯ 発明の名称 診断および治療用抗体複合体

⑰ 特 願 昭62-501784

⑱ 出 願 昭62(1987)2月25日

⑲ 翻訳文提出日 昭62(1987)10月14日

⑳ 国際出願 PCT/US87/00406

㉑ 国際公開番号 WO87/05031

㉒ 国際公開日 昭62(1987)8月27日

優先権主張 ㉓ 1986年2月25日 ㉔ 米国(US) ㉕ 833,204

⑳ 発 明 者 シー, リサ ビー アメリカ合衆国 07009 ニュージャージー、シダー グローブ、リ  
ツジコート 31

㉑ 出 願 人 センター、フォア、モレキュラ アメリカ合衆国 07103 ニュージャージー、ニューワーク、ブリュ  
ー、メディシン、アンド、イミ  
ー ストリート 1  
ユノロジー

㉒ 代 理 人 弁理士 赤岡 迪夫

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許), GB(広域  
特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

最終頁に続く

要 求 の 範 囲

1. 少なくとも1個の既存遊離アミノ基を有するポリマー担体へ共有結合した複数分子の薬物、トキシシン、キレーター、ホウ素付加体または後出し得る鎖状分子を含み、担持した前記担体は前記の少なくとも1個のアミノ基を通じて抗体の炭水化物部分へ還元したシッフ塩基結合によって共有結合されている抗体複合体。
2. 前記抗体はモノクローナル抗体である第1項の抗体複合体。
3. 前記複合体はヒト血清中に可溶である第1項の抗体複合体。
4. 前記担体はアミノデキストランか、または長さが少なくともアミノ酸50個のポリペプチドである第1項の抗体複合体。
5. 前記抗体は抗ガン抗体である第1項の抗体複合体。
6. 前記抗ガン抗体は、肺、乳房、結腸直腸、肝臓、すい臓、尿性癌、胃、腎臓、リンパ腺または表皮細胞ガンによってつくられるもしくは関連する抗原へ特定的に結合する第5項の抗体複合体。
7. 前記抗体は癌ガン性感染または炎症病変によってつくられるもしくは関連する抗原へ特定的に結合する第1項の抗体複合体。
8. 前記抗体は正常器管もしくは組織の特定タイプに特徴的な抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
9. 前記ポリマーはアミノデキストランである第1項の抗体複合体。
10. 前記アミノデキストランはデキストランと1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンの縮合生成物である第9項の抗体複合体。
11. 前記アミノデキストランはその上に約50ないし150個のアミノ基を持っている第9項の抗体複合体。
12. 前記複合体はアミノデキストラン1分子当たりメソトレキセ-

ト約25ないし50分子を有する第11項の抗体複合体。

13. 前記複合体は抗体あたりメソトレキセートアミノデキストラン部分1ないし3個を有する第12項の抗体複合体。
14. 前記ポリマーは長さが少なくとも50個のアミノ酸のポリペプチドである第1項の抗体複合体。
15. 前記ポリマー担体は細胞毒剤の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
16. 前記細胞毒剤は抗ガン薬物である第15項の抗体複合体。
17. 前記抗ガン薬物はメソトレキセート、5-フルオロウラシル、シクロヘキシイミド、ダウノマイシン、デキソソルビシン、クロラムブシル、トレニモン、フェニレンジアミンマスタード、アドリアマイシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシドまたはシクロフォスファミドである第16項の抗体複合体。
18. 前記細胞毒剤はトキシシンである第15項の抗体複合体。
19. 前記トキシシンはリチンもしくはそのA-鎖、またはアメリカマゴウ抗ビールスタンパクである第18項の抗体複合体。
20. 前記ポリマー抗体は抗生物質の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
21. 前記抗生物質は抗ビールス、抗カビまたは抗微生物薬物である第20項の抗体複合体。
22. 前記抗生物質はマイトマイシン、アクテノマイシンまたはそれらの類似体である第20項の抗体複合体。
23. 前記抗体ポリマーはホウ素付加体の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
24. 前記ホウ素付加体はカルボラン誘導体である第23項の抗体複

合体。

25. 前記抗体ポリマーはキレーターの複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
26. 前記キレーターは放射性金属のキレーターである第25項の抗体複合体。
27. 前記キレーターは磁気共鳴増強金属イオンのためのキレーターである第25項の抗体複合体。
28. 前記キレーターは、(a)エチレンジアミンチトラ酢酸もしくはジエチレントリアミンペンタ酢酸の誘導体か、(b)デフェロキサミンか、または(c)1,2-もしくは1,3-ジカルボニル化合物のビスチオセミカルバゾンである第25項の抗体複合体。
29. 前記ポリマー担体は検出し得る標識の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
30. 前記標識は酵素、蛍光化合物または電子転移剤である第29項の抗体複合体。
31. (a)薬物、トキシシン、キレーター、ホウ薬付加体または検出し得る標識の複数分子がそれへ共有結合した、そして少なくとも1個の残存遊離アミノ基を有するポリマー担体を、酸化した炭水化物部分を有している抗体と反応させる工程、および  
(b)生成するシッフ塩基付加物を還元安定化する工程を含んでいる抗体複合体の製造方法。
32. (a)ガンまたは他の病理学的病変によって産生されるまたは関連する抗原へ特異的に結合する、放射標識された抗体と、そして(b)無菌の薬剤的に許容し得る注射ビヒクルとよりなるシンテグラフ造影剤組成物において、前記放射標識された抗体が第26項の抗

体複合体である改良。

33. (a)ガンまたは他の病理学的病変によって産生されるまたは関連する抗原へ特異的に結合する、磁気共鳴増強金属イオンで標識された抗体と、そして(b)無菌の薬剤的に許容し得る注射ビヒクルとよりなる磁気共鳴造影剤組成物において、前記の標識した抗体は第27項の抗体複合体である改良。
34. (a)第5項、第7項、第8項、第15項、第16項、第18項、第20項、第23項および第26項のいずれかの抗体複合体と、そして(b)無菌の薬剤的に許容し得る注射ビヒクルとを含むヒトの処置のための治療組成物。
35. 第1項の抗体複合体を含み、前記ポリマー担体は検出し得る標識の複数分子を担持しているイムノアッセイまたは免疫組織学のための診断組成物。

## 要約

診断および治療用抗体複合体

### 本発明の要旨

本発明は、薬物、トキシシン、キレーター、ホウ薬化合物および検出し得る標識のような診断または治療成分の抗体への複合体に関し、該診断または治療成分は最初アミノデキストランまたは長さが少ないとも50個のアミノ酸ポリペプチドのようなポリマー担体へ担持され、そしてこの中間体が抗腫瘍抗体のような目標指向性へ部位特異的に複合化される。生成する複合体は診断または治療成分を目標組織または器管へ指向し、そこで診断または治療効果が実現される。

目標指向治療効果を得るため抗体へ細胞毒薬物を複合化することは既知である。特に、メソトレキセート(MTX)は抗体へ複合化することができ、そしていくらかの選択的細胞毒性が観察されたことは既知である。細胞毒薬物の抗体担持量を増すことにより、そのような複合体の選択性および細胞毒性を増強することが望ましい。しかしながら、一つの抗体への個々の薬物分子多数の複合化は結局その免疫反応性を減じ、該影響は薬物約10分子以上が担持される時に見られる。

薬物を抗体へ複合化される中間ポリマー担体へ複合化することが提案されている。これは薬物分子の多数が担体自身のより少ない部位において抗体へ結合することができ、そのため免疫反応性がそれほど重大に損傷されないという利点を有する。

一つのアプローチは、Garrett et al., Int. J. Cancer, 31:

661-670, 1983 によって報告されているように、MTXをウシ血清アルブミン(BSA)へ結合し、そして次に中間体を抗体へ不規則に結合することであった。これら著者はBSA(平均分子量70,000)へMTX約37分子を結合することができたが、しかし得られる抗体複合体はもとの抗体のその約28%だけの免疫反応性を持っていた。

ポリマー担体としてポリリジンの使用はRyser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 3867-3870, 1978に報告された。これらの著者は担体あたりMTX13分子を担持することができ、そして免疫反応性は貧弱であることを発見した。加えて、大部分帯電したアンモニウム基の形にあるポリマーの高いアミン含量は、複合体が正常細胞に付着し、細胞毒効果の選択性を無効にした。

Roullandの米国特許第4,046,722は、細胞毒剤の複数の分子が分子量5000ないし500,000のポリマー担体へ共有結合され、そして担持した担体がペンダントアミンもしくはカルボキシル基へのランダム結合によって担体へ共有結合した抗体複合体を開示する。共有結合は複合体の一方の成分のアミノ基と他方の成分のカルボキシル基との間にアミド結合を生ずる直接結合により、または抗体上のアミン基への担体のアミン基のグルタルアルデヒド結合によって実現される。再びこれは抗体の免疫反応性の損失の不利を、そして抗体および/または担体の調製のいくらかのリスクを有する。Ghose et al., J. Natl. Cancer Inst., 61-657-678, 1978は、ガン治療に有用な他の抗体結合細胞毒剤を開示するが、再び共有結合は抗体の酸化した炭水化物部分へではない。これら参考文献は、薬物担持ポリマー担体はよく知られていること、しかし過去におけるそれら

の抗体への結合モードは抗体上のペンダントアミンまたはカルボキシル基を介してランダムであったことを示す。

放射性金属および/または磁気共鳴増強剤として作用することができる金属イオンのためのキレート化基は、大部分はポリペプチド鎖上のペンダントアミン、カルボキシル、スルフィドリルまたはフェニル基へのランダム結合を含む。種々の方法によって抗体へ共有結合されている。トキシンおよび/またはホウ素付加体はまた標的療法のため種々の方法によって抗体へ結合されており、ホウ素基は一旦それらが結合した抗体標的指向抗体によって腫瘍または他の病巣部位へ局在化されたならば熱中性子照射によって活性化される。酵素、DNAセグメント、蛍光性化合物等のような検出し得る標識はアッセイに使用するため再びペンダント基へのランダム結合によって抗体へ結合される。

抗体へのランダム結合および標識の望ましくない効果を回避する試みとして、McKearnらは1983年9月14日に公開されたヨーロッパ特許出願第88,695号において、抗体の炭水化物部分を酸化し、生成したカルボニル基(アルデヒドおよび/またはケトン基)へ遊離アミン基を有する化合物をシッフ塩基形成および場合により運元的安定化によって結合することを含む抗体複合体の製造方法を開示する。この文献はキレーター、薬物、トキシン、検出し得る標識等のような種々の化合物の抗体の酸化された炭水化物部分への部位特異性結合を開示する。結合をもっと容易に開裂させるか、または標的部位において開裂に抵抗性とするため、これら化合物と抗体との間のスペーサーを提供するため、短いペプチドリンカーが開示されている。酸化した炭水化物のアミノデキストランのような

ポリマーへの結合も開示されているが、しかしイムノアッセイに用いられるような、抗体のポリマー被覆ビーズ、プレートまたは管のような不溶性支持体への結合の環境に限られる。この文献には薬物、キレーター等のような標識性分子を担持したポリマー複合体を抗体の酸化した炭水化物部分へ共有結合し、診断剤または治療剤として使用するための可溶性複合体を製造する示唆はない。

従って診断または治療成分を標的組織または器官へ選択的に指向させるため、または高効率および高感度イムノアッセイまたは免疫組織学的用途のため、免疫反応性の最小の減少を高担持と組み合わせる、薬物、トキシン、キレーター、ホウ素化合物または検出し得る標識のような診断的または治療的成分の抗体複合体に対する需要が存在し続ける。

#### 本発明の目的

本発明の目的は、標的部位における診断または治療効果を増強するため、診断または治療成分の複数の分子が抗体へ結合している、標的指向抗体への診断または治療成分の複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、複合体がもとの抗体と実質上同じ免疫反応性を有する、抗体への診断または治療成分の複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、複合体が認知し得るほど非標的組織または組織へ結合せず、そして薬物またはトキシンの全身副作用を最小化しつつ、標的化複合体が腫瘍組織または感染部位へ侵入し、または標的部位においてその治療成分を放出し、そして標的においてその殺菌または抗菌作用を達成する、抗ガンもしくは抗病原体抗体への

抗腫瘍性もしくは抗菌性薬物、またはトキシンの複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、シンチグラフまたは磁気共鳴造影のための標的化造影剤として使用するための、またはラジオアイソトープ療法のための標的化治療剤として使用するための、複数のキレーターを含む抗体複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、中性子活性化治療剤として使用するための、複数のホウ素付加体を含む抗体複合体を提供することである。

本発明の他の目的は、イムノアッセイまたは免疫組織学的ための試薬として使用するための、複数の検出し得る標識を含んでいる抗体を提供することである。

本発明の他の目的は、前述の性質を有する抗体複合体を製造する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、診断および治療成分の病変および感染部位への標的化した放出のため前記抗体複合体を使用する、またはイムノアッセイまたは免疫組織学的用途において増強した検出のため複数の標識を担持する前記複合体を使用する、診断および治療方法を提供することである。

明確書および請求の範囲をさらに検討するとき、本発明のそれ以外の目的および利益は当業者に明らかになるであろう。

#### 本発明の概要

これらの目的は、少なくとも1個の残存アミン基を有するポリマー-抗体へ共有結合した複数の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識を含む、担持させた該抗体が前記少なくとも1個のアミノ基により抗体の炭水化物部分へ運元したシッフ

塩基結合によって共有結合している抗体複合体を提供することによって達成することができる。

本発明はさらに、

- (a) 少なくとも1個の残存アミン基を有し、複数の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識分子がそれへ共有結合したポリマー-抗体を酸化した炭水化物部分を有する抗体へ反応させる工程、および
- (b) 生成するシッフ塩基付加物を運元的に安定化させる工程を含む抗体複合体の製造方法を含む。

本発明はまた、本発明の抗体複合体を使用する、診断および治療方法を含む。

#### 詳細な説明

本発明による抗体複合体の一般的な製造方法は、その炭水化物部分が酸化されている抗体を、複数の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識を担持し、そして少なくとも1個の遊離アミン官能を有する担体ポリマーと反応させることを含む。これは当初のシッフ塩基(イミン)結合をもたらし、該結合は最終複合体を形成する2級アミンへ運元によって安定化される。

担体ポリマーは、好ましくはアミノデキストラン(AD)または少なくとも50個のアミノ酸残基のポリペプチド(PP)であるが、他の実質上均等なポリマー-担体も使用することができる。最終抗体複合体は、生体内診断または治療剤として使用する時、投与の容易性および効率的な標的化のため、ヒト血清に可溶であることが望ましい。このため担体ポリマー上の可溶性官能は最終複合体の血清溶解度を増強するであろう。特に、アミン部分上にヒドロキシル官能

を持ったアミノデキストランが好ましいであろう。

アミノデキストランとの複合体の製造プロセスは、通常デキストランポリマー、有利には約 10,000 ないし 100,000、好ましくは約 30,000 ないし 60,000、そしてさらに好ましくは約 40,000 の平均分子量 (MW) のデキストランから出発する。デキストランは次に、アルデヒド基を発生するようにその炭水化物環の一部の朝顔された酸化を實現するため酸化剤と反応させられる。酸化は慣用操作に従って、種分酸化学試薬、例えば  $\text{NaIO}_4$  によって都合よく實施される。

約 40,000 の MW のデキストランに対しては約 50 ないし 150、好ましくは約 100 個のアルデヒド基が、他の MW デキストランについては約同割合のアルデヒド基が発生するように酸化剤の量を調節するのが便利である。アルデヒド基、および後述のアミン基の多過ぎる数は、ポリマーがその時ポリリジンのように挙動するので有利でない。少な過ぎる数は薬物、トキシシ、キレーター、ホウ素付加体または標識分子の望ましい阻持より少ない阻持を生じ、不利である。

酸化したデキストランは次にポリアミン、好ましくはジアミン、およびさらに好ましくはモノーまたはポリヒドロキシジアミンと反応させる。適当なそのようなアミンは、例えばエチレンジアミン、プロピレンジアミンまたは類似のポリメチレンジアミン、ジエチレントリアミンもしくは類似のポリアミン、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンもしくは類似のヒドロキシル化ジアミンもしくはポリアミン等を含む。以前の研究者は一般にエチレンジアミンを使用していたが、しかし本発明者らは 1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンのような可溶化ジアミンによってより良い結果が得られ

ることを示した。アルデヒド官能のシッフ塩基 (イミン) 基への実質上完全な変換を確保するため、アルデヒド基に対して過剰のアミンが使用される。

生成する中間体の選元的安定化は、シッフ塩基中間体を還元剤、例えば  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  等と反応させることによって實施される。イミン基の 2 級アミン基への実質上完全な還元と、そして未反応アルデヒド基のヒドロキシル基への還元を確保するため、過剰の還元剤が使用される。生成する付加物は、架橋したデキストランを除去するため慣用のライジングカラムの通過によってさらに精製することができる。AD 上の利用し得る 1 級アミノ基の数の推定は秤量したサンプルとトリニトロベンゼンスルホン酸との反応および 420 nm における光学密度の標準との相関関係によって實施することができる。この方法は通常アルデヒド基の計算数の AD 上の 1 級アミン基への実質上完全な変換をもたらす。

アミン官能を導入するためのデキストランの他の慣用の誘導体化方法、例えば臭化シアンの反応および続いてジアミンとの反応も使用することができる。

AD は次に中間付加体を形成するため、例えばジシクロヘキシルカシルボジイミド (DCC) またはその水溶性誘導体を使用し、慣用手段によって調製した活性化剤、好ましくはカルボキシル誘導体誘導体の形の、阻持すべき特定の薬物、トキシシ、キレーター、ホウ素付加体、または標識の誘導体と反応させる。

メソトレキセート (MTX) は本発明による複合体製造に使用するための典型的薬物であり、そして操作を例証するために使用されるであろう。当業者には自明な適当な方法で修飾した他の薬物、ト

キシシ、キレーター、ホウ素付加体および標識に対して類似の工程が使用されるであろう。MTX の活性化は、任意の慣用のカルボキシル活性化試薬、例えば DCC により、場合によってその後活性エステルを形成するため N-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) との反応によって便利に實施される。反応は通常極性中性溶媒、例えばジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO) 等中で實施される。他の活性化エステル、例えば p-ニトロベンゾエート等も無水物と同様に使用することができる。DCC/HOSu 活性化は緩和であり、そして活性化した MTX は AD と水性媒体中で反応できるので好ましい。

AD に対する活性化した MTX の割合は、好ましくは AD 上の利用できるアミノ基の約半数が活性化 MTX のカルボキシル基とアミノ基をつくるような割合である。このようにもし約 40,000 の出発 MW を持っている AD 上に約 100 のアミノ基が利用可能であれば、これらの約 50 までが活性化 MTX と反応しなければならない。MTX : AD 約 50 : 1 の割合を使用し、MTX 約 25 ないし 50 分子が通常導入される。付加物の溶解度減少によるその初期沈降のため、より高い阻持を達成することは困難である。

他の薬物のために使用すべき改良の例示として、5-フルオロウラシル (5-FU) の阻持は 5-フルオロウリジンをその炭水化物において例えば過ヨウ素酸塩を使用して酸化し、この中間体をアミノデキストランと反応させ、そしてシッフ塩基付加物を還元安定化することによって實行することができる。シクロヘキシイミドは、そのシクロヘキサノンカルボニルのアミノデキストランアミン基との直接反応と次に還元安定化か、またはその側鎖ヒドロキシルをジ

イソチオシアネートリンカーの過剰と反応させ、そしてイソチオシアネート誘導体のアミノデキストラン上のアミンとの反応により、またはイミド官能の例えばハロ酸またはハロエステルとの反応および生成するカルボキシル誘導体の例えば DCC による活性化およびアミノデキストラン上のアミンとの縮合によって阻持することができる。

他の例証は抗生物質マイトマイシン C およびその類似体によって提供される。この分子はアミン官能と環状イミンとを有し、そのどちらもアルキル化活性化剤、例えばスクシンイミドジアルキルイオドアセテートまたはスルフォスクシンイミドジアルキル (4-イオドアセチル) アミノベンゾエートと反応させることができ、生成する中間体は次にアミノデキストラン上のアミン基をアルキル化するために使用される。代わりに、カルボキシル基を例えば無水コハク酸を使用して導入し、次に例えば DCC により活性化し、そして活性化した中間体を前のように連絡することができる。

トキシシ、例えばアメリカマゴボウ抗ビルスタンバク (PAP) またはリチン A-チェーン等は、グルタルアルデヒド縮合により、またはタンパクの活性化したカルボキシル基のアミノデキストラン上のアミンとの反応によってアミノデキストランへ結合することができる。

ポリペプチド阻持を AD の代わりに使用することができるが、しかしそれは阻中にアミノ酸を少なくとも 50 個、好ましくは 100 ないし 500 個のアミノ酸を持たなければならない。これらアミノ酸の少なくともいくつかはリジン残基か、またはペンダントカルボキシル基を有するグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基でなけ

ればならない。リジン残基のペンダントアミンおよびグルタミン酸およびアスパラギン酸のペンダントカルボキシルは、薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または標識分子をポリマーへつけるのに便利である。適当なそのようなPPの例は、例えばポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、それらの共重合体、およびこれらアミノ酸とそして生成した担持した担体と抗体複合体へ所望の溶解性質を与えるための他のもの、例えばセリンとの混合ポリマーを含む。

前に挙げた特定例のほかに、腫瘍細胞またはヒトに感染し病変をおこすことがある微生物に対し細胞毒効果を有する多数の薬物およびトキシンの要約に見られる。任意のそのような薬物をこの分野で良く知られた慣用の手段によってADまたはPP上へ担持することができ、そして前記のものの類似によって例証される。

放射性金属または磁気共鳴増強剤のためのキレーターはこの分野でよく知られている。典型例はエチレンジアミンペンタ酢酸(EDTA)およびジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)の誘導体である。これらは典型的にはその周囲にキレーターが担体へそれによって結合し得る基を持っている。そのような基は例えばベンゾイルイソチオシアネートを含み、それによってDTPAまたはEDTAは抗体のアミン基へ結合することができる。本発明においては、この同じ基がADまたはPP上のアミン基へキレーターを連結するために使用される。代わりに、キレーター上のカルボキシル基またはアミン基は、すべて良く知られた方法によって活性化により、またはあらかじめ誘導体としそして次にカップリングによってADま

たはPPへ結合することができる。例えば、Gö-67に対するキレーターであるフェロキサミンは、グルタレートまたはアスルチート残基を含んでいるPPの活性化カルボキシル基へ連結できる、または活性化カルボキシル、イソチオシアネートもしくは類似の基を含有するように適当なリンカーで活性化し、そしてリジン残基をその中に持っているADまたはPP上のアミンへ結合することができる遊離アミノ基を持っている。

ADのアミンへキレーターを連結するための他の方法はキレーターの官能に依り当業者には自明であろう。担体のアミンまたはカルボキシル基へのそのような連結は熟知であり、そしてADまたはPP担体ポリマーへの連結に容易に適合させることができる。キレーター上の他の官能も、例えばスルフィドリルへはアルキル化によりチオエーテルの形成、ヒドロキシルへはアシル化により好ましくはウレタンもしくはエステル形成、芳香環へは後で担体へカップリングするためカルボキシルまたはアミンへ変換し得る基へジアゾカップリングのように自明であろう。

酵素、蛍光化合物、電子転移剤および類似物のような標識もこの技術分野において良く知られた慣用方法によって担体へ連結することができる。これらから製造した標識した担体と抗体との複合体は、標識の担体への直接結合によって製造した抗体複合体のように、イムノアッセイまたは免疫組織学に使用することができる。しかしながら、本発明により複合体の複数の標識の担持は、標的抗原への抗体の低い程度しか得られないアッセイまたは組織学的操作の感度を増大することができる。

ホウ素付加体、例えばカルボランは、抗体へ結合させそして病

へ標的化させる時、熱中子照射によって活性化し、高い細胞毒性短距離効果を生ずるアルファ線放出によって崩壊する放射性原子へ変換することができる。ホウ素付加体と、そして磁気共鳴増強剤の高担持はそれらの効果を強めるのに非常に重要である。カルボラン類は、この技術において良く知られているようにペンダント側鎖上のカルボキシル官能を持つようにつくることのできる。このカルボキシル基の活性化と担体上のアミンとの縮合によるこれらカルボランのADまたはPPへの結合は、有用な担持担体の製造を可能とする。

抗体との付加体の複合化は、抗体の炭水化物部分を酸化し、そして生成したアルデヒド(またはケトン)カルボニルを担持後担体上に残っているか、または薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または標識を担持後それへ導入されたアミノ基と反応させることによって実現される。典型的には、ADのアミンのすべては該担体の担持に使用されず、そして残っているアミンは酸化した担体と縮合してシッフ塩基付加物を形成し、それは通常水素化ホウ素還元剤により還元安定化される。

例えば、MTX-AD付加体は、メソトレキセート療法に匹敵する環境によって生成もしくは関連する抗原へ特異的に結合する任意の抗体へ複合化させることができる。そのような抗原の例は、ヒトβ-毛ゴナドトロピン(HCG)、ガン胎児性抗原(CEA)、アルファフェトタンパク(AFP)、乳房粗大のう乳癌タンパク、乳房上皮細胞抗原、および他の乳房、肺、卵巣、生殖細胞、脳、リンパ腫および白血病抗原である。そのような抗原に対する抗体は、適当な動物宿主を特異した抗ガン抗原または腫瘍もしくは正常器

／組織および／または細胞で免疫化することによって発生させることができる。

これらの抗原および／または細胞はモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを製造する慣用方法に使用することもできる。ヒトまたは霊長類ハイブリドーマモノクローナル抗体は、遺伝子工学およびハイブリドーマ技術の組合わせによって製造することができる。

次の工程は、複合体のために選定した抗体の炭水化物部分の酸化を含む。これは化学的、例えばNaIO<sub>4</sub>または他の糖分解剤により、または酵素的、例えばニューラミニダーゼおよびガラクトースオキシダーゼによって便利に実施される。後者は例えばBanjo et al., Int. J. Cancer, 13: 151-163, 1974に報告されているように、アミノ部分を抗体へ連結するために良く知られた便利な方法である。

酸化した抗体とMTX/AD付加物の割合は、平均約1-3個の付加物が抗体へ連結されるように調節される。これは複合体のMWを約300,000以下にし、これは細胞取りおよび固形腫瘍への拡散を妨害することなく適切な担持を増強し、同時に血流から複合体の急速な排出を回避または少なくとも軽減するのに望ましい。分子の炭水化物部分へ部位特異性修飾でMTX-AD複合体の抗体への結合は、抗体結合活性を保存し、同時に薬物の高担持を許容する。

本発明によって他の複合体を製造するためには類似の操作が使用される。担持したPP担体は、好ましくは抗体の酸化した炭水化物部分との縮合のために残っている遊離リジン残基を持っている。担体上のカルボキシルは、もし必要なら例えばDCCによる活性化とそしてジアミンの過剰との反応によってアミンへ変換することがで

ある。

抗体への薬物の阻持は薬物の力価、抗体価の化の効率、そしてその價的へ到達したときの複合体の有効性に依存するであろう。大部分の場合、抗体上に少なくとも20、好ましくは50、そしてしばしば100以上の薬物の分子を阻持させることが望ましい。本発明による複合体として、薬物をそれが循環中部分的にまたは完全に無毒化する能力は、該薬物の全体的副作用を減らし、そして複合化しない薬物の全体的投与が許容されないときその使用を許容する。例えば、MTXおよびシクロヘキシイミドはしばしば全身的に投与する時あまりに毒性である。しかし抗体上で抗体へ複合した薬物の多くの分子の投与は全身毒性を軽減しながら療法を可能にする。

トキシンは薬物よりしばしばより少なく阻持されるであろうが、しかしそれは抗体へなおトキシンを少なくとも5、好ましくは10および場合によって20分子以上阻持し、そして慢性的放出のため抗体へ少なくとも1個の抗体チェーンを阻持するのが有利である。

先に述べたように、特にキレート化すべき金属イオンが磁気共鳴増強用の常磁性イオンである時は、抗体へキレターの多数の分子を阻持させ、複合体を形成することが高度に有利である。そのような場合、高分子量抗体ポリマー鎖が好ましく使用され、そして2個以上の阻持抗体が抗体の炭水化物部分へ結合される。例えば、平均分子量100,000のデキストランからつくったAD、好ましくは2-ヒドロキシ-1,3-ジアミノプロパンからつくったAD、および好ましくはデキストランあたり約100ないし200アミノ基を含んでいるADを用い、慣用のサイクリックDTPA操作を用い、または側鎖上に活性化したカルボキシルを有する、または側鎖上に他の

反応性アシル化基、例えばイソチオシアネートを有する、または側鎖上にアルキル化官能、例えばアルファードベンジルもしくはヨードアルキル基を有する他の誘導体の過剰と反応させることにより、約100個のDTPAキレター基が連結される。抗体の酸化した炭水化物部分へのいくつかの阻持した抗体ポリマーチェーン、好ましくは1.5ないし4チェーンの連結は、キレター複合体が慣用手技により、好ましくは金属不含有溶液中においてそしてトランスキレート化剤を使用して金属イオンで阻持された後、単一抗体上に150ないし400個の常磁性イオンの阻持を許容するであろう。

生体内診断および治療用途のための本発明の抗体複合体の投与は、診断もしくは治療成分が抗体へ直接連結している、または阻持した抗体が抗体のアミノ酸残基上のアミンもしくはカルボキシル基へ非部位特異性阻持でランダムに結合することによって連結されている、同一または類似の薬物、トキシン、キレター、またはホウ素付加体の複合体に類似の方法によるであろう。そのような投与モードは例証目的のためにここに既に引用した参照中に例示されており、そして文献に広く見られるであろう。そのためそれらは当業者によく知られているであろう。もっと精密な投与方法がそれぞれの剤について、再びこの分野でよく知られているように必要であろう。

MTX-AD-Abの投与は、処理すべき腫瘍のタイプおよび位置に応じて種々の方法で実施することができる。例えば、投与は静脈内、動脈内、腹腔内、胸腔内、包膜内、皮下、局所カテーテルを通る注入、または直接の病巣内注射によることができる。

複合体は一般にリン酸緩衝食塩水中の無菌水溶液として投与されるであろう。複合体約10ないし200mgの投与単位が通常毎日

数日の期間投与されるであろう。患者の感受性を減らすため、投与量を減らすか、および/または他のスペースからの抗体および/または低アレルギー性抗体、例えば産成ヒトもしくは重鎖抗体を使用することが必要となり得る。

静脈内、動脈内、または胸腔内投与は通常肺、乳房および白血病腫瘍のために使用される。腹腔内投与は卵巣腫瘍に推奨される。包膜内投与は脳腫瘍および白血病に推奨される。皮下投与はホジキン病、リンパ腫および乳ガンに推奨される。カテーテル注入は転移した肺、乳房または肝臓の生殖細胞がんにも有用である。病巣内投与は肺および乳房病巣に有用である。

上記例示は本発明による複合体の一般的投与方法を示すであろう。熱中性子活性化療法のためのホウ素付加体阻持抗体の複合体は同様な方法で通常実施され、そして中性子放射が実施される前に非標的化複合体が消失するまで待つことが有利であろう。そのような消失は例えば米国特許第4,624,846から知られているように、第2の抗体の使用によって加速することができる。

さらに考案することなく、当業者は以上の説明を使用して、本発明をその全範囲にわたって利用することができるものと信じられる。従って以下の好ましい具体例は単に例示と考えるべきであり、記載の範囲の限定と考慮してはならない。以下の実施例においてすべての濃度は未補正の重量で表わされ、特記しない限りすべての部およびパーセントは重量による。

#### 実施例1

##### アミノデキストランの製造

デキストラン (MW 40,000 ジグマ) 1gをポリアルデヒドデキス

トランを精製するように水溶液中で  $\text{H}_2\text{IO}_4$  (0.33g) で部分酸化する。混合物を暗所で室温で1時間かきまぜる。溶液をアミコンセル (YN 10 膜, MWCO=10,000) によって濃縮し、セフテックス6-25 カラムによって精製する。物質を凍結乾燥し、白色粉末 89.8g (収率 89.8%) を得る。

ポリアルデヒドデキストラン (800mg, 0.02ミリモル) を  $\text{H}_2\text{O}$  80mlに溶かし、次に1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン (200mg, 2.15ミリモル) と室温で24時間反応させる。水酸化ナトリウム (11.8mg, 0.311ミリモル) を加え、室温で24時間反応させる。物質を YN-10および XN-50を通して膜口過し、小分子を除き、同時に分子量を選定した範囲に調製する。

アミノ基のレベルを参照物質としてグルコサミンを用い、TNBS (トリニトロベンゼンスルホン酸) によってアッセイする。NH<sub>2</sub>レベルは100/デキストランと実測される。

#### 実施例2

##### メソトレキセート/アミノデキストラン中間体の製造

##### (a) メソトレキセートの活性化

乾燥反応バイアル中へ、無水DMF中のメソトレキセート 45.4mg (0.1ミリモル, シグマ) を注射器で導入する。無水DMF 7590μl中のN-ヒドロキシスクシンイミド (23mg, 0.2ミリモル, シグマ) 溶液と、無水DMF 7550μl中の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (41.5mg, 0.2ミリモル, シグマ) の溶液を加える。反応混合物を暗所で無水条件下室温で16時間かきまぜる。白色沈澱を遠心し、透明溶液をシールしたびん中に-20°Cで貯える。

##### (b) アミノデキストランとの反応

アミノデキストラン (10mg,  $2.5 \times 10^{-4}$  モル) を 2 ml の PBS, pH 7.2 中に溶かす。活性化した MTX ( $125 \times 10^{-4}$  モル) を徐々に加える。溶液を室温で 5 時間かきまぜ、そしてセファデックス G-25 カラムによって精製する。ボイド容積を定め、反応緩衝液に対して透析する。凍結乾燥後、製品 2.1 mg (収率 2.1%) が得られる。メソトレキセート結合は 370 nm における吸収により、38 メソトレキセート/デキストランであると決定される。

#### 実施例 3

##### 抗体複合体の製造

##### (a) 抗体の酸化

抗 CEA モノクローナル抗体をメタ過ヨード酸ナトリウムによって選択的に酸化し、炭水化物部分上にアルデヒド基を生成させる。操作は以下のとおりである。PBS, pH 7.2 中の抗体 (2 mg/ml) をメタ過ヨード酸ナトリウム (2.84 mg/ml) 20 μl と暗所中室温で 90 分間反応させる。次にエチレングリコール (2 μl) を加える。15 分後酸化した抗体をセファデックス G-25 カラムにより精製する。1 g G 分画を集め、約 1 ml に濃縮し、以下の複合化に使用する。

##### (b) 複合化

酸化した抗体 (約 2 mg) を PBS, pH 7.2 中の実施例 2 に従って製造したメソトレキセート/アミノデキストラン中間体 (2.5 mg,  $82.5 \times 10^{-4}$  モル) と反応させる。溶液は 4℃ で 48 時間反応させる。生成する Schiff 塩基を水素化シアノホウ素 (抗体より 10 倍過剰) により安定化する。セフクリル S-300 上のサイジングクロマトグラフィーの後、複合体は対照ピークとして現れ、そして集め

られる。タンパク濃度はローリーアッセイによって 1.05 mg (収率 52.5%) であると決定される。メソトレキセートの濃度は 370 nm ( $\epsilon = 6500$ ) における吸収によって決定される。この複合体は 1 g G 分子あたりメソトレキセート 9.1 分子を含有することが見られ、これは少なくとも 2 個のデキストランブリッジが抗体へ結合していることを示す。

この複合体の免疫反応性を間接的蛍光標識技術を使用してフローサイトメトリーによって調べる。データを未修飾抗体と比較し、そしてこの方法による複合化は抗体の免疫反応性を変えないことを示す。

#### 実施例 4

##### 5-FU 抗体複合体の製造

平均分子量 10,000 のポリリジンを過ヨード酸で酸化した 5-フルオロウリジンと反応させる。縮合生成物を水素化ホウ素ナトリウムで還元安定化する。保持した PP はポリマー上に平均 40 個の 5-FU 基を有する。保持した抗体と酸化した抗体との実施例 3 に類似の操作による縮合は、1 ないし 3 個の抗体グループが結合した複合体をつくる。

#### 実施例 5

##### キレート複合体の製造

分子量 100,000 のアミノデキストランをサイクリック DTPA と反応させ、その上に平均 100 DTPA を有する保持抗体をつくる。生成した保持抗体と酸化した抗体との縮合、続いて還元安定化は、免疫反応性の無視し得る減少を伴って抗体あたり 1 ないし 3 個の抗体グループを持った複合体を与える。

ガドリニウム (III) イオンによる、またはインジウム-III、ガリウム-67、テクネチウム-99m による抗体の保持はシンチグラフまたは磁気共鳴造影のための高濃度保持された複合体をつくる。例えばイットリウム-90 の保持は治療的に有用な複合剤をつくる。

#### 実施例 6

##### MTX 複合体の細胞毒性

LS174T (結腸腺ノカルチノーマ) 細胞をトリプシン/EDTA で処理し、完全培養地 (RPMI-1640, 10% FCS, 1000 μg/ml ペニシリン, 1000 μg/ml ストレプトマイシン, 25 mM HEPES) で洗ひ、そして各処理について 6 検体ずつ 100 μl 中 4 × 10<sup>4</sup> 細胞/ウエルにおいてマイクロタイターウエルストリップへ加える。4 時間、37℃、8% CO<sub>2</sub> の後、抗体-メソトレキセート複合体を適量な対照 (遊離 MTX, 遊離 MTX + 遊離抗体) と共に加える。細胞を追加の 24 時間 37℃、8% CO<sub>2</sub> においてインキュベートし、その時 75-80-セレンメチオニン 0.1 μCi を 16 ないし 18 時間加える。プレートは 4 回洗浄する。個々のウエルを分離し、ガンマカウンターでカウントする。約 3 μM の投与量における複合体は細胞死亡率約 50% を生ずる。

#### 実施例 7

##### 腫瘍治療

肺の両方の葉に拡散転移した小細胞カルチノーマを有するヒト患者を 10 mg/ml の濃度で PBS 中 MTX-AD-抗 CEA 抗体複合体 100 mg の溶液の静注によって処置する。処置前および複合体最終投与 30 日後の CAT 走査は腫瘍体積の 60% 縮小を示す。

以上の実施例は、本発明の一般的にまたは特定の記載した反応

剤および/または作業条件をもって以上の実施例に使用したものを置き換えることによって同様の成功度をもってくり返すことができる。

以上の説明から、当業者は本発明の必須の特徴を容易に確かめることができ、その精神および範囲を逸脱することなく、種々の用途および条件に適応させるため、本発明の種々の改変および修飾をなすことができる。

手続補正書

特表昭63-503138(8)

(補正の内容)

請求の範囲

特許庁長官 殿 昭和63年8月/8日

1. 事件の表示

PCT/US87/00406

2. 発明の名称

診断および治療用抗体複合体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 センター、フォア、モレキュラー、メディ  
シン、アンド、イミューノロジー

4. 代理人

住所 大阪市東区淡路町2丁目40番地4  
弘栄ビル 電話(06)222-0547

氏名 (6036) 弁理士 赤岡 進

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正による増加する発明の数 なし

7. 補正の対象

請求の範囲

7. 補正の内容

別紙のとおり

方式  
審査



12. 前記複合体はアミノデキストラン1分子当たりメソトレキセート約25ないし50分子を有する第1項の抗体複合体。
13. 前記複合体は抗体あたりメソトレキセートアミノデキストラン部分1ないし3個を有する第12項の抗体複合体。
14. 前記ポリマーは長さが少なくとも50個のアミノ酸のポリペプチド鎖である第1項の抗体複合体。
15. 前記ポリマー-抗体は細胞毒剤の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
16. 前記細胞毒剤は抗ガン薬物である第15項の抗体複合体。
17. 前記抗ガン薬物はメソトレキセート、5-フルオロウラシル、シクロヘキシイド、ダウノマイシン、デキサソルピシン、クロラムブシル、トレニモン、フェニレンジアミンマスタード、アドリアマイシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシドまたはシクロフォスファミドである第16項の抗体複合体。
18. 前記細胞毒剤はトキシンである第15項の抗体複合体。
19. 前記トキシンはリチンもしくはそのA-鎖、またはアメリカマゴボウ抗ビールスタンパクである第18項の抗体複合体。
20. 前記ポリマー-抗体は抗生物質の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
21. 前記抗生物質は抗ビールス、抗カビまたは抗微生物薬物である第20項の抗体複合体。
22. 前記抗生物質はマイトマイシン、アクテノマイシンまたはそれらの類似体である第20項の抗体複合体。
23. 前記抗体ポリマーはホウ素付加体の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。

1. 少なくとも1個の残存遊離アミノ基を有するポリマー-抗体へ共有結合した複数分子の薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識分子を含み、担持した前記抗体は前記の少なくとも1個のアミノ基を通じて抗体の炭水化物部分へ還元したシッフ塩基結合によって共有結合されている抗体複合体。
2. 前記抗体はモノクローナル抗体である第1項の抗体複合体。
3. 前記複合体はヒト血清中に可溶である第1項の抗体複合体。
4. 前記抗体はアミノデキストランか、または長さが少なくともアミノ酸50個のポリペプチドである第1項の抗体複合体。
5. 前記抗体は抗ガン抗体である第1項の抗体複合体。
6. 前記抗ガン抗体は、肺、乳房、結腸直腸、肝臓、すい臓、尿生殖器、腎臓、リンパ腺または表皮細胞ガンによってつくられるもしくは関連する抗原へ特異的に結合する第5項の抗体複合体。
7. 前記抗体は非ガン性感染または炎症病変によってつくられるもしくは関連する抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
8. 前記抗体は正常器管もしくは組織の特定タイプに特異的な抗原へ特異的に結合する第1項の抗体複合体。
9. 前記ポリマーはアミノデキストランである第1項の抗体複合体。
10. 前記アミノデキストランはデキストランと1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンの縮合生成物である第9項の抗体複合体。
11. 前記アミノデキストランはそれの上に約50ないし150個のアミノ基を持っている第9項の抗体複合体。
24. 前記ホウ素付加体はカルボラン誘導体である第23項の抗体複合体。
25. 前記抗体ポリマーはキレーターの複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
26. 前記キレーターは放射性金属のキレーターである第25項の抗体複合体。
27. 前記キレーターは磁気共振増強金属イオンのためのキレーターである第25項の抗体複合体。
28. 前記キレーターは、(a)エチレンジアミンテトラ酢酸もしくはジエチレントリアミンペンタ酢酸の誘導体か、(b)デフェロキサミンか、または(c)1,2-もしくは1,3-ジカルボニル化合物のビスチオセミカルバゾンである第25項の抗体複合体。
29. 前記ポリマー-抗体は検出し得る標識の複数分子を担持している第1項の抗体複合体。
30. 前記標識は酵素、蛍光化合物または電子転移剤である第29項の抗体複合体。
31. (a)薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体または検出し得る標識の複数分子がそれへ共有結合した、そして少なくとも1個の残存遊離アミノ基を有するポリマー-抗体を、酸化した炭水化物部分を持っている抗体と反応させる工程、および (b)生成するシッフ塩基付加物を還元安定化する工程を含んでいる抗体複合体の製造方法。
32. 無菌の薬理学的に許容し得る注射用ビヒクルに担持されたシンチグラフ造影剤の形の第26項の抗体複合体。
33. 無菌の薬理学的に許容し得る注射用ビヒクルに担持された磁気



國際調查報告

34. 無菌の短期的に許容し得る注射用ビヒクルに保持されたヒトの処置のための治療組成物の形の第5項、第7項、第8項、第15項、第16項、第18項、第20項、第23項、および第26項の抗体複合体。

35. 免疫組織化学のための診断組成物の形の第29項の抗体複合体。

[illegible]

⑤ Int. Cl.

厅内整理番号

C-6742-4C  
8318-4H  
8318-4H  
8318-4H  
A-7906-2G  
A-7906-2G

アメリカ合衆国08867ニユージャージー、ピッツタウン、ボックス  
6, アールデー1

アメリカ合衆国07078ニユージャージー、ショートヒルズ、ロング  
ヒルドライブ 397